

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Edgardo D. CAROSELLA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR99/00386

INTERNATIONAL FILING DATE: 19 FEBRUARY 1999

FOR: METHOD FOR SELECTING TUMOURS EXPRESSING HLA-G WHICH ARE  
SENSITIVE TO ANTICANCER TREATMENT, AND USES THEREOF**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:


In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
FRANCE	98/02071	20 FEBRUARY 1998
FRANCE	98/09470	24 JULY 1998

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/FR99/00386**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

**22850**

  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

0 9 / 6 2 5 8 0 3 1 AVR. 1999

EJU

REC'T 13 APR 1999

WIPO

PCT

FR 99 / 00 3 8 6

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

## SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

24 JUL 1998

98 09470

24 JUL 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☐ brevet d'invention

☒ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale



☒ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

« Compositions anti-tumorales à base d'antigènes HLA-G ou d'anticorps anti-HLA-G ».

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Forme juridique

Etablissement public

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

Pays

31-33 rue de la Fédération, 75015 PARIS

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

*B. Ores*

Béatrice ORES  
n° 92-4046

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9809470

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION : COMPOSITIONS ANTI-TUMORALES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine  
75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CARSELLA Edgardo Delfino  
23 rue George Sand, 75016 PARIS (FRANCE)

DAUSSET Jean  
9 rue de Villersexel, 75007 PARIS (FRANCE)

MOREAU Philippe  
8 rue Bougainville, 91170 VIRY-CHATILLON (FRANCE)

PAUL Pascale  
29 rue de la Grange aux Belles, 75010 PARIS (FRANCE)

ROUAS-FREISS Nathalie  
44 Boulevard Arago, 75013 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) inventeur(s) ou du mandataire

Le 24 juillet 1998,

Béatrice ORES  
n° 92-4046

La présente invention est relative à une méthode de sélection de tumeurs solides sensibles à un traitement anticancéreux, qui inhibe ou prévient l'activité HLA-G desdites tumeurs solides et ses applications.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), et dont le domaine  $\alpha 3$  est associé à la  $\beta 2$  microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire  $\alpha 1$ , exon 3 : domaine extracellulaire  $\alpha 2$ , exon 4 : domaine extracellulaire  $\alpha 3$ , exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'anti-

gène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le  
 5 transcript primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcript primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb (G3).

Le transcript G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence  
 10 décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  sont directement joints ; l'ARNm G3  
 15 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 1$  et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant  $\alpha 1$ ) avec une  
 séquence AC (issue du domaine codant  $\alpha 3$ ), ce qui entraîne la création d'un codon  
 20 AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine  $\alpha 3$  dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire  
 25 .221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de l'HLA-G dans la protection du fœtus vis-à-vis d'une réponse immunitaire maternelle (induction d'une tolérance immunitaire). Toutefois, il est précisé que le rôle de la protéine  
 30 G3, qui ne contient pas le domaine  $\alpha 3$  n'est pas établi.



Certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ; le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; et le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; ils ont également montré que ces différents transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Il existe donc au moins 5 ARNm HLA-G différents qui codent potentiellement 5 isoformes d'HLA-G.

Bien que le fœtus puisse être considéré comme une semiallogreffe, les cellules fœtales survivent et ne sont pas rejetées par la mère ; il est apparu que les molécules HLA-G, exprimées à la surface des trophoblastes protègent les cellules fœtales de la lyse par les cellules *natural killer* (NK) maternelles (CAROSELLA E.D. et al., *C.R. Acad. Sci.*, 318, 827-830 ; CAROSELLA E.D. et al ; *Immunol. Today*, 1996, 407-409).

Des études antérieures ont montré que l'expression des molécules HLA-G à la surface de cellules cibles permet de protéger lesdites cellules cibles de l'activité lytique des cellules NK de la couche déciduale de l'endomètre maternel (CHUMBLEY G. et al., *Cell Immunol.*, 1994, 155, 312-322 ; DENIZ G. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4255-4261 ; ROUAS-FREISS N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 5249-5254). Il est à noter que ces cellules cibles sont obtenues par transfection avec des vecteurs comprenant l'ADN génomique de HLA-G, générant potentiellement tous les transcrits alternatifs.

Les cellules NK expriment des récepteurs des molécules du CMH de classe I (*killer inhibitory receptors* ou KIR ou NKIR pour récepteurs inhibiteurs NK), qui sont responsables de l'inhibition de la cytotoxicité, lorsque ces molécules HLA, agissant comme ligands, sont reconnues par ces récepteurs ; par exemple,

N. ROUAS-FREISS et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, **94**, 5249-5254) ont montré que l'expression de HLA-G protégeait de la lyse, les cellules cibles K562 (lignée cellulaire érythroleucémique humaine), transfectées par le gène HLA-G. Ces cellules sont habituellement sensibles aux cellules NK. Certains des Inventeurs ont montré que  
5 les cellules NK n'expriment aucun transcrit HLA-G, ce résultat confirmant que les produits d'expression du gène HLA-G jouent vraisemblablement un rôle dans l'immuno-tolérance (TEYSSIER M. et al., *Nat. Immunol.*, 1995, 14, 262-270).

Compte tenu du rôle important que peut jouer la molécule HLA-G aussi bien dans les pathologies où les cellules NK sont particulièrement actives  
10 (maladies autoimmunes, transplantations) ou sont au contraire inhibées (présence anormale de molécules HLA-G, notamment sur certaines tumeurs ou dans les infections virales), les Inventeurs, poursuivant leurs travaux ont plus particulièrement étudiés les cellules tumorales. Ils ont trouvé, de manière surprenante, qu'au moins certaines tumeurs solides expriment l'antigène HLA-G et ont montré que cet antigène  
15 HLA-G joue un rôle fonctionnel dans la protection des cellules tumorales (tumeurs solides) de la destruction par les cellules NK. Ils ont en outre montré la présence effective de certaines des isoformes d'HLA-G à la surface desdites cellules tumorales.

Toutefois, également de manière surprenante, selon les lignées tumorales, le profil HLA-G (transcrits et protéines) sera différent.

20 Par exemple, dans certaines lignées de mélanome, on peut observer la présence des isoformes HLA-G2/G4 et G3, qui protègent ces lignées de la lyse cellulaire induite par les cellules NK, comme le fait l'isoforme HLA-G1, dans d'autres lignées.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à  
25 des outils de sélection des tumeurs solides sensibles à un traitement qui inhibe les antigènes HLA-G.

La présente invention a pour objet une méthode d'établissement du profil de transcription HLA-G d'une tumeur solide, caractérisée en ce qu'elle comprend :

30 (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral ;

(ii) l'extraction de l'ARNm, à partir dudit échantillon : on peut utiliser notamment, une méthode modifiée de Chomczynski et Sacchi, en utilisant le réactif RNA NOW (Ozyme, France) ;

(iii) la transcription inverse (RT) dudit ARN ;

5 (iv) les amplifications successives ou concomitantes des ADNc obtenus en (iii), en présence d'amorces spécifiques de chaque isoforme d'HLA-G et l'analyse des produits d'amplification obtenus, par électrophorèse et/ou hybridation spécifique et

10 (v) l'établissement du profil de transcription HLA-G dudit échantillon.

De manière préférée, les transcriptions inverses sont amorcées avec des oligo-dT sur de l'ARNm, préalablement dénaturé, par exemple à 65°C, en présence d'une transcriptase inverse, telle que la transcriptase inverse M-MLV (Gibco-BRL, Life technologies).

15 Également de manière préférée, l'amplification des ADNc est réalisée par polymérisation en chaîne (PCR), en utilisant des amorces spécifiques des différentes isoformes d'HLA-G, conformément aux Tableaux suivants :

Amorces	Séquences nucléotidiques	Températures d'hybridation (°C)	Isoformes amplifiées
G.257 G3.U	5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	61	G1, G2, G3, G4, G5, G6
G.526 G3.U	5'-CCAATGTGGCTGAACAAAGG 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	61	G1, G4, G5
G.-3-4 G3.U	5'-ACCAGAGCGAGGCCAAGCAG 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	65	G3
G.-3 G3.U	5'-ACCAGAGCGAGGCCAACCCC 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	65	G2, G6
G.-3 G.i4b	5'-ACCAGAGCGAGGCCAACCCC 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG	61	G6
G.526 G.i4b	5'-CCAATGTGGCTGAACAAAGG 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG	61	G5

Sondes	Séquences nucléotidiques	Températures d'hybridation (°C)	Isoformes détectées
GR	5'-GGTCTGCAGGTTTCATTCTGTC	60	HLA-G1, G2, G3, G4, G5, G6
G.647 F	5'-CCACCACCCTGTCTTTGACT	60	HLA-G1, G2, G5, G6
G.I4 F	GAGGCATCATGTCTGTTAGG	55	HLA-G5, G6
G.927 F	5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG	55	HLA-G1-G4

La présente invention a également pour objet une méthode d'établissement du profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,
- (ii) éventuellement le marquage des cellules dudit échantillon,
- (iii) la lyse des cellules,
- (iv) la mise en contact des cellules lysées avec différents anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I, pour former, éventuellement des complexes isoforme d'HLA-G/anticorps et
- (v) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon, par détection des complexes formés à l'étape (iv).

De manière préférée, à l'étape (iv), on obtient des immunoprécipités, qui sont séparés, à l'étape (v) par électrophorèse, transférés sur membrane et détectés.

Conformément à l'invention, lesdits anticorps sont de préférence des anticorps monoclonaux.

Cette expression des HLA-G par les cellules tumorales permet de mieux évaluer le type de traitement potentiellement efficace.

La présente invention a également pour objet un vaccin anti-tumoral, apte à inhiber les antigènes HLA-G, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par des cellules tumorales autologues ou un antigène HLA-G5 soluble ; de tels vaccins induisent la formation de lymphocytes T cytotoxiques, spécifiques de tumeurs et d'anticorps anti-HLA-G.

Lorsque ledit vaccin est constitué de cellules autologues (notamment des cellules tumorales de l'individu à traiter exprimant au moins une isoforme d'HLA-G), lesdites cellules sont de préférence modifiées de manière à induire effectivement la production d'anticorps anti-HLA-G. Les cellules sont par exemple soumises à un traitement au cholestérol ou à un traitement hyperbare.

De manière avantageuse, ledit antigène anti-HLA-G5 soluble est couplé à une protéine appropriée et éventuellement associé à un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate de calcium.

Ledit vaccin est de préférence administré par voie sous-cutanée ou intra-dermique.

La présente invention a également pour objet une composition anti-tumorale, apte à inhiber les antigènes HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'anticorps anti-HLA-G (immunothérapie passive).

La présente invention a en outre pour objet des produits contenant des anticorps anti-HLA-G et des facteurs de régulation de l'expression des HLA-G, aptes à inhiber les antigènes HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans le traitement des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G.

Parmi lesdits facteurs de régulation, on peut notamment noter les hormones sexuelles telles que la testostérone.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre :

(A) : l'analyse RT-PCR des ARNm des isoformes d'HLA-G dans les cellules de mélanome. Des amorces pan-HLA-G [amorce G.257 (exon 2) et 3G.2 (extrémité 3' non-traduite)] sont utilisées pour l'amplification PCR des transcrits HLA-G correspondants aux différentes isoformes connues d'HLA-G. L'ADNc des cellules de choriocarcinome JEG-3, les trophoblastes du premier trimestre (TRO) et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont utilisés comme cellules contrôles respectivement pour les taux de transcription élevés et les taux de transcrip-

tion basals d'HLA-G. IgR, M8 et M74 correspondent à l'amplification de l'ADNc de lignées cellulaires de mélanomes. Les bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiqués par des flèches.

5 Les produits de la PCR, co-amplifiés au cours de la même réaction, avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane à l'aide d'une sonde  $\beta$ -actine ;

(B) : cette figure correspond à la détection RT-PCR des transcrits alternatifs dans les cellules de mélanome. L'amorce 3 est spécifique des isoformes HLA-G2 et HLA-G2 soluble (G6) qui ne possèdent pas l'exon 3. L'amorce 3.4 permet  
10 de distinguer les transcrits ARNm HLA-G4. Les amorces G.526 et I4b amplifient de manière spécifique le transcrit HLA-G5, qui correspond à la forme soluble. Les produits de la PCR, co-amplifiés dans la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine, sont détectés sur la même membrane par une sonde spécifique de la  $\beta$ -actine ;

(C) : cette figure correspond à l'analyse RT-PCR de l'ARNm des  
15 HLA classiques de classe I. Les ADNc des PBMC, des trophoblastes et des cellules de mélanome sont amplifiés par RT-PCR, en utilisant des amorces spécifiques HLA-A, HLA-B, HLA-C ou HLA-DRA. Les bandes spécifiques sont révélées en utilisant des sondes spécifiques (HLA—A, HLA—B, HLA—C et HLA—DRA). Les produits de la PCR, co-amplifiés dans la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine, sont détec-  
20 tés sur la même membrane par une sonde spécifique de la  $\beta$ -actine (contrôle quantitatif des taux d'ARN).

- la figure 2 illustre l'analyse RT-PCR des ARNm des isoformes d'HLA-G dans les biopsies de métastases de mélanome (analyse *in vivo* et *ex vivo* de la peau). Les amorces pan-HLA-G G.257 et 3G.U sont utilisées pour l'amplification  
25 RT-PCR des transcrits HLA-G, à partir de métastases de peau *ex vivo* (MEL) et à partir de biopsies de peau saine, du même patient (HS) ; des cellules JEG-3 et des trophoblastes du premier trimestre sont utilisés comme contrôles (taux élevé de transcription HLA-G). Les bandes spécifiques HLA-G sont révélées par hybridation avec une sonde GR-spécifique, localisée dans l'exon 2. Les bandes correspondant aux  
30 transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées par des flèches.

- la figure 3 illustre la détection des protéines HLA-G1 dans les cellules JEG-3 mais pas dans les cellules de mélanomes IGR et M8 à l'aide de l'anticorps monoclonal W6/32 :

(A) : immunoprécipitation des protéines marquées métaboliquement.

5 (B) : les protéines de surface biotinylées de mélanome et les cellules JEG-3 sont immunoprécipitées avec l'anticorps monoclonal W6/32 ; les immunoprécipités sont séparés par SDS-PAGE à 12 % et transférés sur membrane de cellulose. Les molécules de surface de classe I sont détectées avec de la peroxydase conjuguée à de la streptavidine.

10 - la figure 4 illustre l'immunoprécipitation des isoformes HLA-G des cellules de mélanomes IGR par un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne lourde d'HLA-G libre et par les anticorps monoclonaux 4H94 et HCA2. Les cellules sont marquées pendant 30 min, immunoprécipitées avec les anticorps spécifiques et les immunoprécipités sont analysés par SDS-PAGE à 10 %. L'anticorps 4H94, qui réagit  
15 avec la chaîne lourde HLA-G (bande de 39 kDa dans les cellules JEG-3), présente des réactions croisées avec les chaînes lourdes d'HLA-A, B et/ou C (bande de 45 kDa dans toutes les cellules testées).

- la figure 5 illustre :

(A) : l'effet de l'expression HLA-G dans le mélanome IGR sur la  
20 sensibilité à la lyse par le clone YT2C2-PR. Les cellules K562 transfectées, soit avec le vecteur seul (K562-pRc/RSV), soit avec le vecteur HLA-G1 (K562-HLA-G1) ou le vecteur HLA-G2 (K562-HLA-G2) et les lignées M8, M74 et IGR sont utilisées comme cellules cibles (T). Le clone YT2C2-PR est utilisé comme cellule effectrice (E) dans un rapport cellule effectrice/cellule cible (E/T) de 50:1. Les résultats sont  
25 exprimés comme le pourcentage de lyse enregistré en 4 h dans un test de libération du chrome 51. La libération spontanée n'excède jamais 10 % de la libération maximale. Cette expérience est réalisée au moins 5 fois et produit à chaque fois les mêmes résultats ;

(B) : l'inhibition de la lyse induite par le clone YT2C2-PR est due à  
30 un signal « off » transmis par les cellules IGR. La lignée M8 est utilisée comme cellule cible (T), marquées au chrome. Le clone YT2C2-PR est utilisé comme cellule effectrice (E) dans un rapport E/T de 50:1. Les cellules IGR sont ajoutées en tant que

cellules inhibitrices dans un rapport cellule inhibitrice/cellule cible de 100, 50 et 25:1. 0 indique qu'aucune cellule IGR n'a été ajoutée dans le test.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

### **EXEMPLE 1 : Analyse des profils HLA-G de différentes lignées tumorales**

#### **A/ MATERIEL ET METHODES**

##### **1/ Lignées cellulaires**

La lignée cellulaire érythroleucémique humaine K562 (ATCC) et la  
lignée cellulaire leucémique T immature (clone YT2C2-PR) à activité NK) sont  
maintenues dans un milieu RPMI 1640 complémenté avec du sérum de veau foetal à  
10%, inactivé par la chaleur, de la L-glutamine 2mM, de la gentamicine à 1 µg/ml et  
de la fungizone (Sigma, Saint-Quentin, France) et cultivées à 37°C dans un incuba-  
teur, humidifié à atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Les transfectants K562 sont  
sélectionnés dans un milieu contenant de la généticine à 1 mg/ml (G418 sulfate,  
Sigma).

La lignée cellulaire humaine de choriocarcinome HLA-G-positive  
dénommée JEG-3 (ATCC) est cultivée dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté  
avec du sérum de veau foetal à 10%, inactivé à la chaleur, des antibiotiques et de la L-  
glutamine 2mM. Les lignées cellulaires ne contiennent pas de mycoplasmes.

Outre les lignées précitées, on utilise :

- des lignées de mélanome IGR (HLA-A2, A3, B58/mâle), M74 (HLA-A1, A2, B8, B14/femelle) et M8 (HLA-A1, A2, B12 et B40/mâle),
- des tissus trophoblastiques du premier trimestre, obtenus après  
IVG ; ces tissus sont découpés en fines lamelles et immédiatement utilisés pour  
extraire l'ARN, et
- des cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC), obtenues à partir de volontaires sains et isolées sur un gradient de densité Ficoll-Hypaque 1077.

##### **2/ Échantillons tumoraux**

Des biopsies sont effectuées à partir d'échantillons tissulaires de patients.



### 3/ Anticorps monoclonaux

Les anticorps suivants sont utilisés :

W6/32 : IgG2a, anti-chaînes  $\alpha$  de HLA de classe I associées à la  $\beta$ 2-m (Sigma) ; HCA2 : IgG anti-HLA-A et G et des IgG anti-HLA-G.

5

### 4/ RT-PCR

L'ARNm total est extrait à partir de  $10^7$  cellules à l'aide du réactif RNA NOW (Biogentex, Inc.) conformément aux recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dénaturant. Les ADNc sont préparés à partir de 10  $\mu$ g d'ARN total traités avec de la DNase I (Boehringer Mannheim) en utilisant une amorce oligo-(dT)<sub>12-18</sub> et la transcriptase inverse M-MLV (GIBCO-BRL). Les amplifications RT-PCR sont réalisées en utilisant les amorces suivantes : G.257 (exon 2) et G3.U (3'UT) (Ishitani A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 3947-3951 ; Kirszenbaum M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 4209-4213 et Moreau P. et al., *C.R. Acad. Sci*, 1995, 318, 837-842), pour détecter toutes les isoformes d'ARNm d'HLA-G. Une amplification spécifique de chaque forme d'ARNm d'HLA-G est réalisée avec les ensembles d'amorces suivants :

- G.526 (exon 3) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G1 et G4 ;
- G.526 (exon 3) et G.i4b (intron 4) pour l'isoforme G5 ;
- G.-3 (recouvrant partiellement les exons 2 et 4) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G2 et G6 ;
- G.3-4 (recouvrant partiellement les exons 2 et 5) et G3.U (3' UT) pour l'isoforme G3.

Les ADNc des HLA classiques de classe I sont amplifiés comme décrit dans King et al. (*J. Immunol.*, 1996, 156, 2068-2076), en utilisant une amorce 5' unique HLA-5P2 et 3 amorces 3', HLA-3pA, HLA-3pB et HLA-3pC qui amplifient respectivement les ARNm HLA-A, HLA-B et HLA-C.

Les amorces spécifiques DRA sont décrites dans King et al. précité.

Une co-amplification de l'ADNc de  $\beta$ -actine est réalisée dans chaque expérience avec le test Clontech (16 cycles), de manière à évaluer les quantités comparatives d'ARN dans les échantillons. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et colorés à l'aide de bromure d'éthidium. La

30

spécificité des produits PCR est confirmée par blotting alcalin des fragments dans du NaOH 0,4 N sur des membranes de Nylon (Hybond N+, Amersham, France).

Les sondes HLA-G spécifiques sont les suivantes :

- GR spécifique de l'exon 2,
- 5       - G.647 F (5'-CCACCACCCTGTCTTTGACT : spécifique de  
l'exon 4),
- G.I4 F (GAGGCATCATGTCTGTTAGG : spécifique de l'intron  
4), et
- G.927 F (5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG : spécifique de  
10 l'exon 5).

Les autres sondes sont les suivantes :

- sonde spécifique HLA-A (5'GGAGGACCAGACCCAGGACAC-  
G),
- sonde spécifique HLA-B (5'AGCTCCGATGACCACAACTGC)
- 15       - sonde spécifique HLA-C (5'TGTCCTAGCTGCCTAGGAG) et
- sonde spécifique HLA-DRA (TGTGATCATCCAGGCCGAG).

Les filtres sont exposés sur des films Kodak (Biomax) avec des écrans amplificateurs pendant 4 à 16 heures à -80°C.

#### 20   5/ Marquage métabolique, immunoprécipitation et électropho- rèse sur gel.

Les cellules sont métaboliquement marquées avec 0,5 mCi de [<sup>35</sup>S] méthionine + [<sup>35</sup>S] cystéine (Amersham) pour 2.10<sup>7</sup> cellules pendant 30 min ou 1 h dans un milieu sans méthionine ni cystéine contenant 5 % de sérum de veau foetal.

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid et lysées dans  
25 un tampon constitué de 1 % de Triton X100/PBS pendant 30 min à 4°C. Après  
préclarification par incubation avec une colonne Sépharose- protéine A CL-4B  
(Pharmacia) et du sérum normal, les lysats cellulaires préclarifiés sont incubés avec  
des anticorps spécifiques (W6/32, 4H94 et HCA2). Les produits immunoprécipités  
sont lavés 5 fois dans un tampon comprenant 0,1 % de Triton X100/20 mM Tris pH  
30 7,5 150 mM de NaCl, 0,05 % de NaN<sub>3</sub> (Dunq) et une fois dans un tampon comprenant  
0,1 % Triton X100, 0,1 % SDS/Dunq. Les protéines liées sont éluées à partir des billes  
par chauffage à 100°C pendant 5 min dans un tampon à 2 % de SDS. Les échantillons

sont alors analysés sur un gel SDS-PAGE à 12 ou 10 %. Les gels sont séchés et exposés à un film Kodak XAR-5 à -70°C.

#### 6/ Immunoprécipitation des protéines biotinylées de surface et Western blot.

5 Les protéines de surface sont marquées avec de la biotine. Après lavage dans du PBS,  $1,5 \cdot 10^7$  cellules sont incubés dans 1 ml de PBS froid contenant 5 ml de NHS-SS-biotine (Pierce, Rockford, IL) pendant 15 min à 4°C. Les groupes actifs résiduels sont inhibés dans 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 10 min à 4°C. Les cellules sont lysées dans 1 % de Triton X100/PBS. Les protéines précipitées avec l'anticorps  
10 W6/32 sont séparées sur SDS-PAGE à 12 %, transférées sur membrane de nitrocellulose et mises en présence d'un conjugué peroxydase de raifort-streptavidine. Après un lavage extensif de la membrane, la réaction colorée est réalisée en utilisant le réactif de détection de Western blotting ECL (Amersham, France), après quoi la membrane est exposée à un film Kodak à température ambiante.

#### 15 7/ Essais de cytotoxicité.

L'activité cytolytique des cellules mononucléées du sang périphérique, des cellules NK et des cellules YT2C2-PR (cellules effectrices ou E) à l'encontre des transfectants HLA-G (cellules cibles ou T) est estimée à l'aide de tests de libération pendant 4 heures du chrome 51, dans lesquels les cellules effectrices sont mélan-  
20 gées avec  $5 \cdot 10^3$  de cellules cibles marquées au chrome 51 ( $100 \mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$ -chromate de sodium, Amersham, UK), dans différents rapports E/T, dans des plaques de microtitration dont le fond est en forme de U.

Après 4 heures à 37°C dans un incubateur humidifié contenant 5% de  $\text{CO}_2$ , 100  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés pour un comptage par scintillation en  
25 phase liquide (Wallac 1450 Microbeta, Pharmacia, France). Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme suit :

pourcentage de lyse spécifique =  $\frac{[\text{cpm dans le puits expérimental} - \text{cpm de libération spontanée}]}{[\text{cpm de libération maximale} - \text{cpm de libération spontanée}]} \times 100$ .

La libération spontanée est déterminée par incubation des cellules  
30 cibles (T) marquées avec le milieu. La libération maximale est déterminée par solubilisation des cellules cibles dans de l'HCl 0,1 M. Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 10% par rapport à la libération maximale. Les résultats

sont présentés comme des moyennes de trois échantillons. Dans les expériences dans lesquelles les anticorps monoclonaux sont utilisés pour bloquer l'interaction HLA-G-NK, les cellules cibles sont incubées avec l'anticorps monoclonal correspondant, puis lavées et incubées avec un anticorps F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-souris (Jackson  
 5 Immunoresearch, USA) pour éviter la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) par interaction des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, exprimés sur les cellules NK avec le premier anticorps utilisé. Les toxicités des anticorps monoclonaux sont également vérifiées dans chaque essai et sont toujours inférieures à 3%.

## 10 II - Résultats

### 1/ Identification des différents transcrits d'HLA-G dans des lignées cellulaires de mélanome.

Les ADNc d'HLA-G de 3 lignées cellulaires de mélanome (IGR, M8 et M74) sont amplifiés, à l'aide des amorces précédemment décrites (A. Ishitani et al.,  
 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 3947-3951 ; M. Kirszenbaum et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 4209-4213), dérivées des séquences spécifiques de l'exon 2 et de la région 3' non traduite (voir Matériel et Méthodes).

La lignée JEG-3 de choriocarcinome et des cellules trophoblastiques, qui présentent des taux élevés de transcrits d'HLA-G, sont utilisées comme témoins  
 20 positifs et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de volontaires sains sont utilisés comme contrôle négatifs (taux faibles de transcrits HLA-G).

L'hybridation des produits de la PCR ont permis d'identifier des taux importants d'ARNm d'HLA-G dans 2 lignées cellulaires de mélanome, à savoir IGR et M74, tandis qu'aucun signal ne peut être détecté dans la lignée cellulaire de  
 25 mélanome M8.

Dans les cellules JEG-3 et les trophoblastes, tous les transcrits d'HLA-G sont détectés (figure 1A).

Dans les cellules de mélanome IGR, tous les transcrits sont également détectés par les amorces pan-HLA-G (figure 1A).

30 Cependant, les amorces pan-HLA-G ne permettent pas de distinguer entre les signaux HLA-G1 et HLA-G5, qui sont présents tous les deux, au niveau d'une bande correspondant à 1 000 pb, ni entre les signaux HLA-G2 et HLA-G1, qui

comigrent sous la forme d'un fragment de 600 pb. Une identification RT-PCR permet d'isoler les isoformes à l'aide d'amorces spécifiques (P. Moreau et al., C. R. Acad. Sci., 1995, **318**, 837-842) (voir Matériel et Méthodes).

Les cellules IGR expriment toutes les isoformes d'HLA-G sous  
5 forme de transcrits, HLA-G4 et HLA-G5 étant exprimés à des taux faibles (figure 1B).

Dans la lignée cellulaire de mélanome M74, les amorces pan-HLA-G détectent des bandes correspondant à HLA-G1 et HLA-G5 (1 000 pb) (signaux intenses), un signal pour HLA-G2 et G4 (600 pb), mais aucun signal pour HLA-G3 (300 pb) (figure 1A). Les amorces pour les isoformes spécifiques révèlent que dans  
10 ces cellules les isoformes G1 et G4 sont plus abondantes que dans les PBMC tandis que le taux de transcrit G5 est comparable à celui observé dans les PBMC.

Des taux faibles d'ARNm HLA-G2 et HLA-G6 (forme soluble d'HLA-G2) sont détectés dans ces cellules M74, tandis qu'une amplification spécifique du transcrit HLA-G3 confirme l'absence d'HLA-G3 observée avec les amorces  
15 pan-HLA-G dans ces cellules (figures 1A et 1B).

Aucun signal d'hybridation HLA-G n'est observé dans les cellules M8 (figures 1A et 1B).

L'analyse PCR des transcrits du CMH classiques, à l'aide d'amorces spécifiques HLA-A, HLA-B, HLA-C (A. King et al., J. Immunol., 1996, 156, 2068-  
20 2076) et HLA-DR (M. Bull et al., Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 3792-3796) révèle des taux élevés de transcription des HLA de classe I classiques dans toutes les lignées cellulaires de mélanome, tandis qu'on ne détecte que peu ou pas du tout de transcrits HLA-DRA dans ces cellules (figure 1C).

Ces résultats sont confirmés par une analyse en cytométrie de flux, à  
25 l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes HLA de classes I et II ; ils montrent que les molécules HLA-A, B et C sont exprimées à la surface des lignées cellulaires de mélanome, alors qu'aucun antigène de classe II ne peut être détecté.

Le Tableau ci-après résume les profils de transcription obtenus avec ces différentes cellules.

	JEG-3	PBMC	TRO	IGR	M8	M74
G1	++++	++	++++	+++	-	+++
G2	++	+	+++	++	-	+/-
G3	+++	-	+++	++	-	-
G4	+++	+	+++	+	-	+
G5	++++	++	++++	+	-	++
G6	++	+	++	+	-	+/-

### 2/ Analyse de la transcription HLA-G dans des biopsies de mélanome *ex-vivo*.

5           Tous les transcrits d'HLA-G sont détectés à des taux importants dans les biopsies de mélanome, alors que seule la bande de 1 000 pb est détectée dans la peau humaine saine (figure 2). Ces résultats ont été confirmés sur d'autres biopsies et montrent que les taux importants de transcription observés dans les cellules de mélanome, sont spécifiques de ces derniers.

### 10           3/ Analyse des protéines HLA-G dans les cellules de mélanome.

Pour déterminer si les transcrits d'HLA-G détectés dans les mélanomes sont traduits en protéines HLA-G, des études d'immunoprécipitation ont été effectuées avec différents anticorps monoclonaux anti-HLA de classe I, sur des lysats de cellules marquées métaboliquement (<sup>35</sup>S méthionine/cystéine).

15           La comparaison est réalisée en présence d'un contrôle positif (cellule JEG-3) et d'un contrôle négatif (cellules de mélanome M8).

Les résultats d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal W6/32 sont illustrés à la figure 3.

20           Avec les cellules JEG-3, l'anticorps W6/32 immunoprécipite deux protéines de 45 kDa (molécule HLA-C) et de 39 kDa (isoforme HLA-G1 liée à la membrane) (figure 3A).

Dans les cellules IGR et M8, seulement une protéine de 45 kDa est détectée.

25           Des résultats similaires sont obtenus par immunoprécipitation de protéines de surface biotinylées (figure 3B).

Ces données montrent que la protéine HLA-G1 n'est pas exprimée dans les cellules IGR, même si ces dernières expriment l'ARNm correspondant.

Cependant, l'absence de protéine HLA-G1 dans les cellules IGR n'exclut pas l'expression de 3 autres isoformes d'HLA-G (HLA-G2, G3 et G4).

5 Ces protéines ne peuvent pas être révélées par l'anticorps monoclonal W6/32, en raison de leur incapacité à s'associer avec la  $\beta$ 2m.

Pour mettre en évidence ces protéines, l'immunoprécipitation de protéines marquées à la méthionine ( $^{35}$ S-méthionine) est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux qui reconnaissent l'HLA-G libre, l'HLA-G dénaturée et l'HLA-A  
10 (anticorps HCA2) et un épitope localisé au niveau du domaine  $\alpha$ 1 présent dans toutes les isoformes de la protéine HLA-G (anticorps monoclonal Ig anti HLA-G).

L'anticorps monoclonal révèle la présence de la protéine HLA-G1 de 39 kDa dans les cellules JEG-3 et son absence dans les cellules IGR (figure 4).

Des bandes additionnelles, qui migrent à 32-34 kDa et à 18 kDa, qui  
15 correspondent respectivement à la taille de la protéine HLA-G2 et/ou de la protéine HLA-G4 ou G3, sont détectées dans les cellules IGR aussi bien avec l'anticorps monoclonal Ig anti HLA-G qu'avec l'anticorps HCA2 (figure 4).

Les bandes additionnelles, spécifiques de la protéine HLA-G, ne sont pas observées dans les cellules M74 et M8 qui ne présentent pas les transcrits  
20 d'HLA-G correspondants (figure 4).

#### **4/ Protection de la lignée IGR de la cytolyse induite par les cellules NK.**

Les cellules YT2C2-PR sont utilisées comme cellules effectrices  
NK.

25 Seule la lignée cellulaire IGR, qui exprime les isoformes HLA-G2 et/ou G4 et G3, abolit la lyse induite par le clone YT2C2-PR.

La lignée cellulaire de mélanome M74, qui exprime les antigènes classiques du CMH de classe I mais qui présente un défaut sélectif dans la transcription et l'expression des isoformes HLA-G2 et HLA-G3 est lysée par le clone YT2C2-  
30 PR.

Une lyse est également observée avec la lignée cellulaire M8, qui exprime les antigènes classiques du CMH de classe I, mais qui ne transcrit aucun ARNm d'HLA-G (figure 13A).

5 Pour montrer que seules les HLA-G sont impliquées dans cette inhibition de la lyse induite par les cellules NK, plusieurs lignées cellulaires EBV-B n'exprimant aucune HLA-G mais partageant au moins une allèle HLA-A, B ou C avec la lignée IGR sont utilisées comme cellules cibles.

Toutes ces lignées EBV-B sont lysées par le clone YT2C2-PR, montrant que les antigènes HLA-A, B et C ne sont pas impliqués dans la protection du  
10 mélanome IGR, de la lyse YT2C2-PR.

Pour montrer que l'inhibition de la lyse, induite par le clone YT2C2-PR par les cellules IGR, n'est pas due à un signal transmis par cette lignée cellulaire mais est bien liée à une résistance intrinsèque de ces cellules IGR aux cellules NK, les cellules IGR ont été utilisées comme inhibiteurs, dans un test de cytotoxicité dans  
15 lequel les cellules cibles (T) sont des cellules M8 et les cellules YT2C2-PR, les cellules effectrices (E).

La figure 5 B montre que les cellules IGR inhibent de manière efficace la lyse des cellules M8 par le clone YT2C2-PR ; cette inhibition est proportionnelle au nombre de cellules IGR utilisé pour le test compétitif.

20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.



**REVENDICATIONS**

1°) Vaccin anti-tumoral, apte à inhiber les antigènes HLA-G, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par des cellules tumorales autologues ou un antigène HLA-G5 soluble.

5                   2°) Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsque ledit vaccin est constitué de cellules autologues (notamment des cellules tumorales de l'individu à traiter exprimant au moins une isoforme d'HLA-G), lesdites cellules sont modifiées de manière à induire la production d'anticorps anti-HLA-G.

3°) Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit anti-  
10 gène anti-HLA-G5 soluble est couplé à une protéine appropriée et éventuellement associé à un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate de calcium.

4°) Composition anti-tumorale, apte à inhiber les antigènes HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'anticorps anti-HLA-G.

5°) Produits, aptes à inhiber les antigènes HLA-G, contenant des  
15 anticorps anti-HLA-G et des facteurs de régulation de l'expression des HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans le traitement des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G.

6°) Produits selon la revendication 5, caractérisés en ce que lesdits  
20 facteurs de régulation sont notamment sélectionnés dans le groupe constitué par les hormones sexuelles.

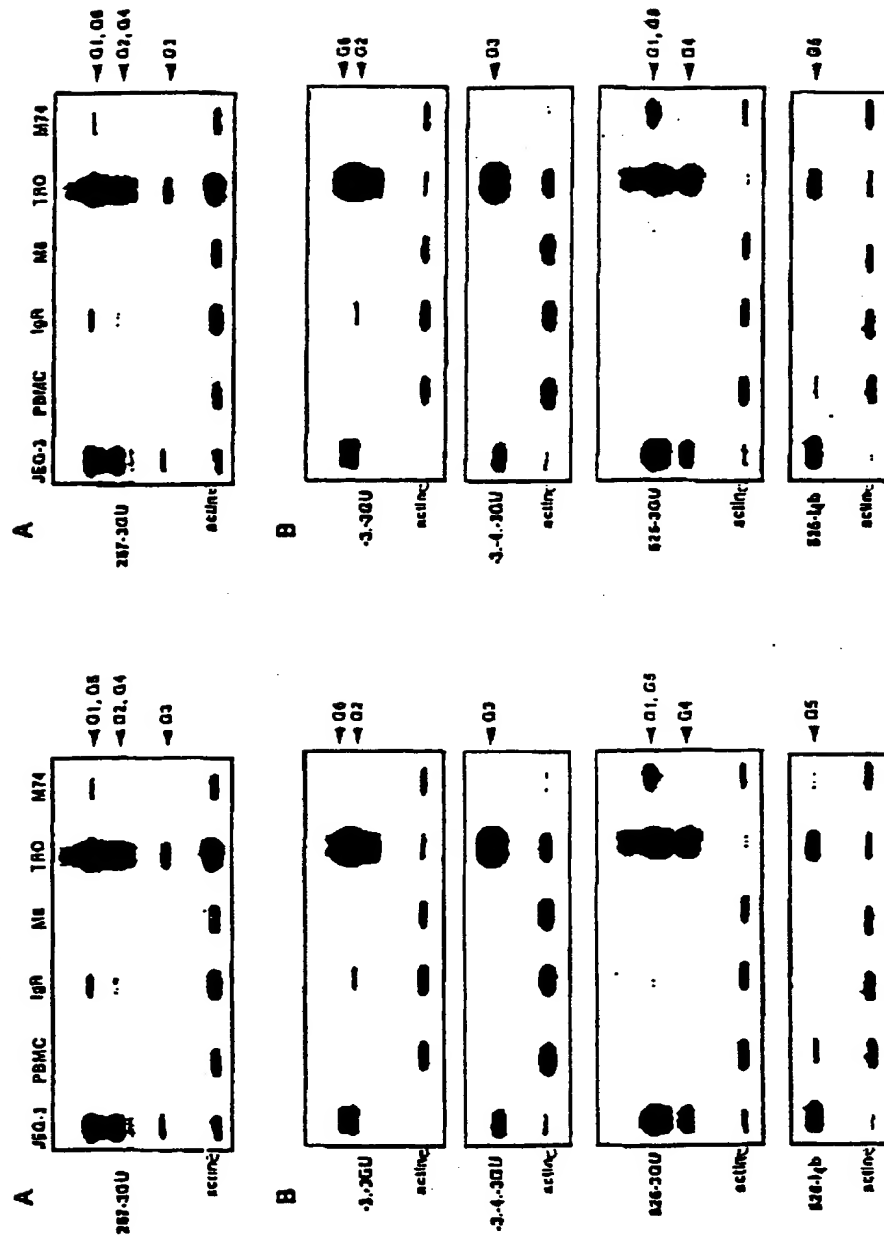


FIGURE 1.1

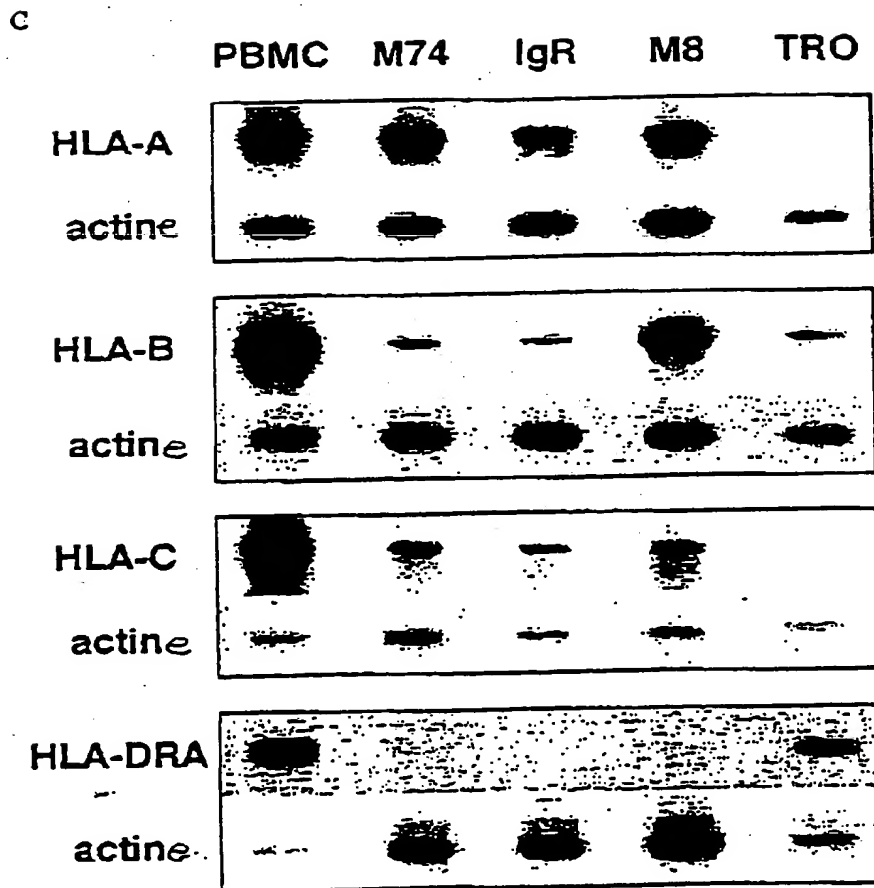
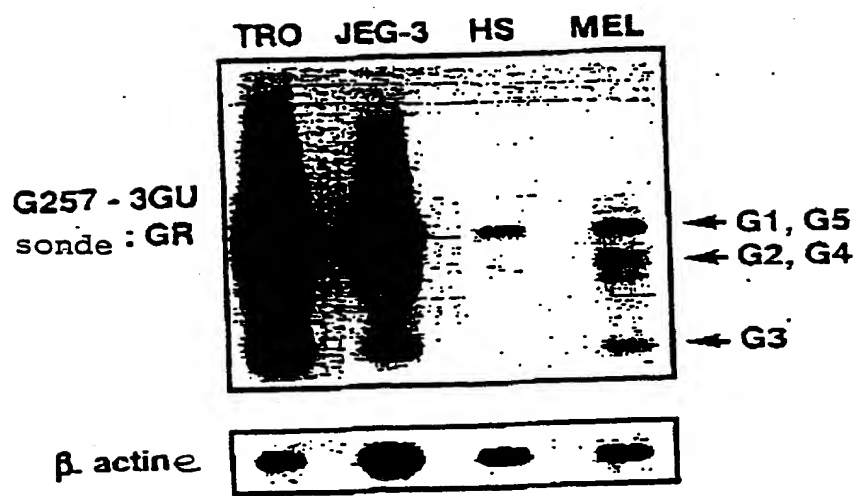


FIGURE 1.2



---

FIGURE 2

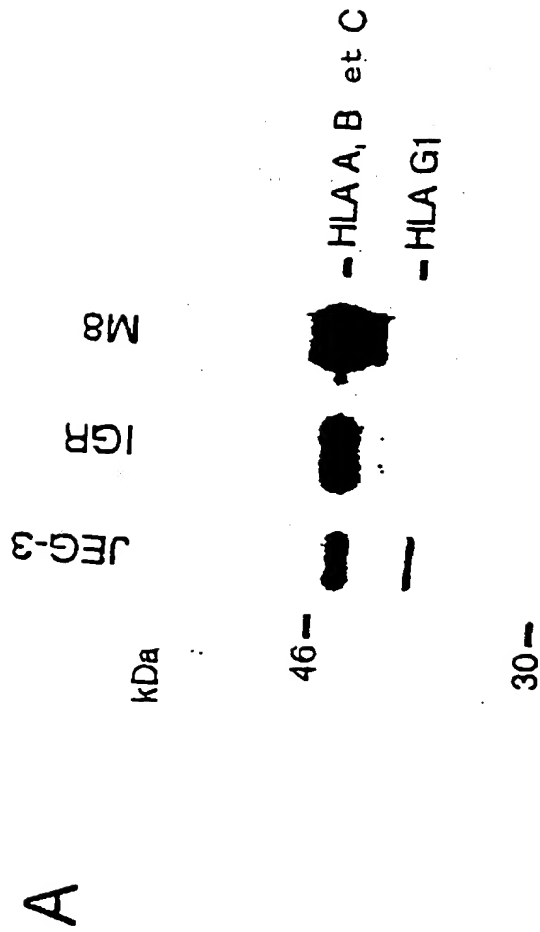


FIGURE 3.1

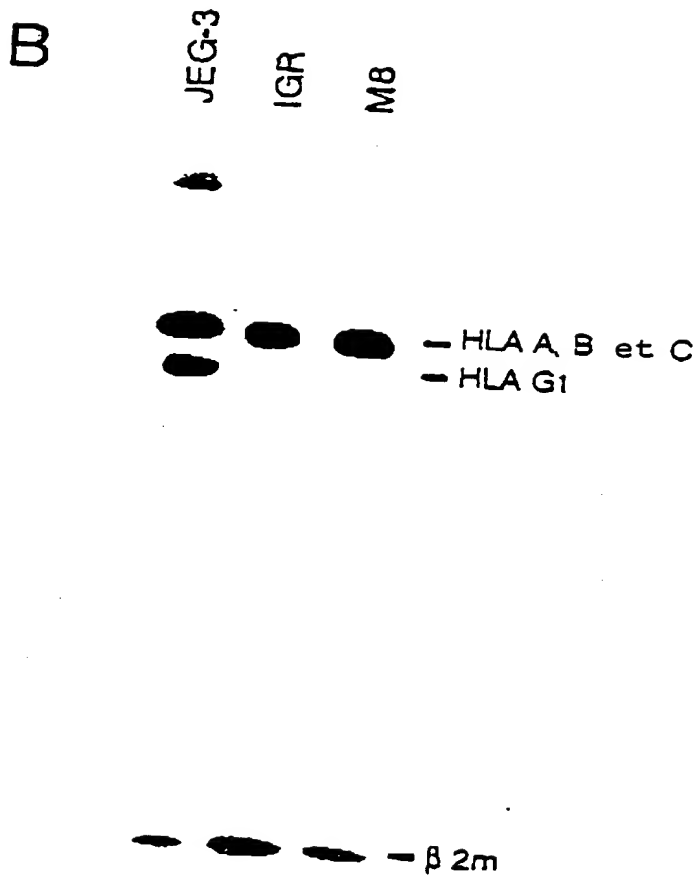


FIGURE 3.2

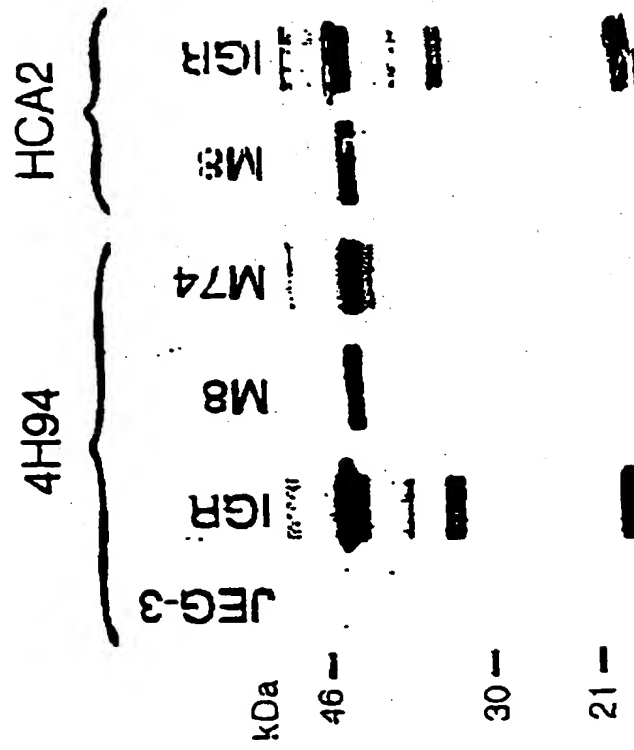
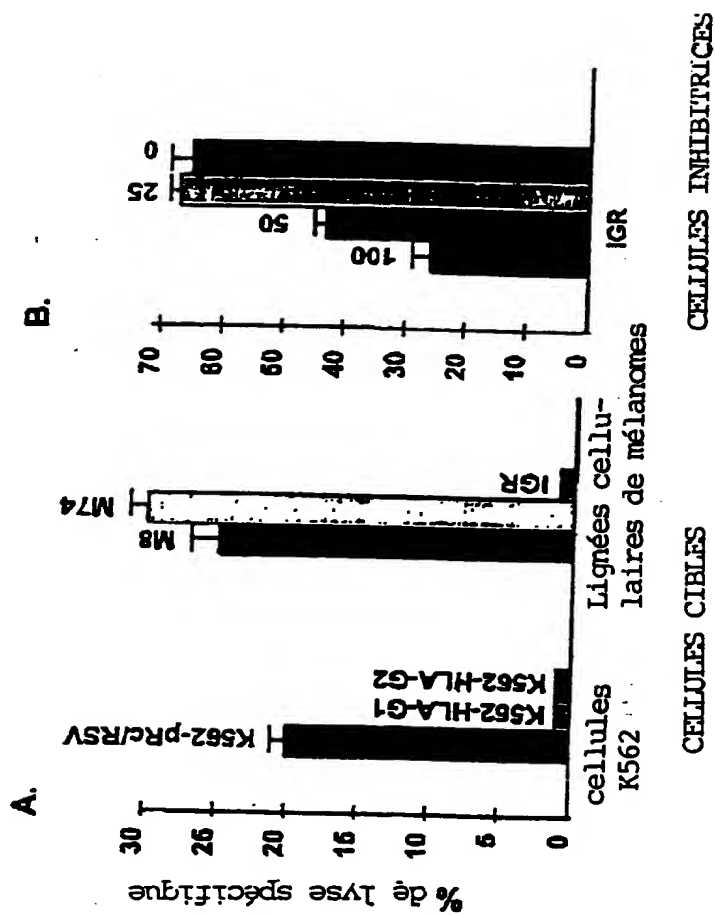


FIGURE 4



**FIGURE 5**